

鹿茸多胺对小鼠肝细胞 RNA 聚合酶活性的影响

王本祥 陈晓光 徐惠波 张伟 张洁*

(吉林省中医中药研究院中药所药理室, 长春 130021.)

摘要 多次给小鼠 po 鹿茸多胺 (PASPA) 30 mg/kg, 可明显促进 [^3H] leucine 和 [^3H] uridine 掺入肝组织蛋白质和 RNA。体外实验证明, 鹿茸多胺在较低浓度 (1 ~ 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 时, 对 RNA 聚合酶活性呈明显的增强作用。提示, 鹿茸多胺刺激小鼠肝组织蛋白和 RNA 合成效应是由于其能够明显增强 RNA 聚合酶活性, 尤其是显著增强 RNA 聚合酶 II 的活性。

关键词 鹿茸多胺; 蛋白质; 核糖核酸; 核糖核酸聚合酶 II

自古以来, 中医认为鹿茸是滋补强壮和生精益血之要药, 我们曾报告, 长期灌服鹿茸水提取物可增加老化小鼠 (SAM-P) 肝脏蛋白质含量⁽¹⁾。并证明鹿茸乙醇提取物可促进 [^{14}C] leucine 和 [^{14}C] uridine 掺入老化小鼠 (SAM-P) 肝肾和血浆蛋白及 RNA⁽²⁾。进一步研究证明, 鹿茸多胺为其促进核酸和蛋白质合成的有效成分⁽³⁾, 当鹿茸多胺剂量为 30mg/kg 时, 可促进 [^3H] leucine 和 uridine 掺入小鼠肝组织蛋白质和 RNA 中。鹿茸多胺中腐胺和精脞为其主要活性成分, 腐胺在促进核酸和蛋白质合成时, 明显增强小鼠肝细胞核 RNA 聚合酶的活性。本研究旨在进一步探讨鹿茸多胺在促进核酸和蛋白质合成的有效剂量 (30mg/kg) 下, 对 RNA 聚合酶作用的特点及其对离体 RNA 聚合酶的影响。

材 料 和 方 法

动物 昆明种雄性小鼠, 体重为 20 ~ 22 g, 购于本院动物室。在观察室饲养 7 日后用于实验。

鹿茸多胺 所用鹿茸取自梅花鹿 (*Cervus nippon* Temminck var. *mantchuricus* Swinhoe) 的未骨化角, 由本所方剂室从鹿茸乙醇提取物中提得鹿茸多胺, 经高效液相分析其中腐胺, 精脞和精胺分别为 70.9, 26.3 和 2.8%, 临用前以生理盐水配成鹿茸多胺混悬液, 供灌胃给药。

试剂 [^3H] leucine ($3.7 \times 10^8 \text{Bq}/\text{mmol}$), [^3H] uridine ($1.85 \times 10^8 \text{Bq}/\text{mmol}$), [^3H] CTP ($1.85 \times 10^9 \text{Bq}/\text{mmol}$) 为中国原子能所产品, 三磷酸腺苷 (ATP), 三磷酸鸟苷 (GTP) 和三磷酸尿苷 (UTP), 乙硫醇 (β -mercaptoethanol), 海胺 (benzethonium chloride, Hyamine), 鹅膏蕈碱 (α -amanitine) 均为 sigma 产品, Hyflo super-Cell 为日本富山医科药科大学和汉药研究所日合奖助教授惠赠。

本文于 1989 年 8 月 31 日收到。

* 吉林省医药工业研究所进修生

一. 方法 肝脏组织蛋白和RNA的分离及放射活性的测定以及肝细胞核RNA的分离及RNA聚合酶制备均按我们以前报告的方法⁽³⁾。

二. 给药方式 将32只小鼠均分两组, 一组小鼠于4日内每日灌胃鹿茸多胺30 mg/kg, 另一组按10 ml/kg灌胃生理盐水。各组小鼠于末次给药1 h, 两组各取8只小鼠分别ip [³H] leucine 3.7×10^5 Bq/鼠和 [³H] uridine 3.7×10^5 Bq/鼠。40 min后断头处死小鼠, 取肝组织测定同位素标记物掺入RNA和蛋白质的cpm值(实验一)。剩余两组(对照和给药各一组)小鼠; 于末次给药后1 h, 断头处死, 取肝组织制备RNA聚合酶, 分别用于实验二~四。

三. RNA聚合酶活性测定 按Hiai⁽⁴⁾测定 [³H] CMP(来自 [³H] CTP) 掺入酸不溶部分的方法测定RNA聚合酶活性。

四. RNA聚合酶(I, II和III)活性的测定 参照Iijima和Higashi的方法⁽⁵⁾。此反应分三个系统进行, A系统(250 μ l)各成分含量(μ mol/L)为 Tris-HCl (pH 8.0) 25, β -mercaptoethanol 0.2, MgCl₂ 1.5, KCl 1.25, ATP 0.1, GTP 0.1, UTP 0.1 并含有 [³H] CTP 3.7×10^4 Bq (1.0 μ Ci), α -amanitin (0 μ g/ml); B系统(250 μ l)各成分含量(μ mol/L)为 Tris-HCl (pH 8.0) 25, β -mercaptoethanol 2, MnCl₂ 1.25, (NH₄)₂SO₄ 30, ATP 0.1, GTP 0.1, UTP 0.1, 并含 [³H] CTP 3.7×10^4 Bq; C系统(250 μ l)除含 α -amanitin (0.0 μ g/ml)外, 其它成分与B系统相同。各反应系统均加酶制备液(含蛋白200 μ g), 在37 $^{\circ}$ C温孵20 min后, 加入5 ml含有50 mg Hyflo-super Cell 载体的冷5%高氯酸(HClO₄)终止反应。离心(10,000 \times g, 3 $^{\circ}$ C, 5 min)得到酸不溶部分, 悬浮于1 $^{\circ}$ C水1 ml中, 加入1 mol/L KOH 0.15 ml, 继之再加入5% HClO₄ 10 ml, 离心(10,000 \times g, 3 $^{\circ}$ C, 5 min), 沉淀物用5% HClO₄洗二次, 而后收集在滤纸上, 用乙醇、乙醇-乙醚(1:1)和乙醚各洗一次, 干燥后的沉淀物用Hyamine methanol溶液在45 $^{\circ}$ C溶解3 h, 加入闪烁液中计数。

五. 蛋白质及RNA测定 蛋白质测定按Lowry法⁽⁶⁾ RNA测定按Schjeide法⁽⁹⁾。表中数值为mean \pm SD, 以“t”试验测定差异显著性。

结果

一. 鹿茸多胺对 [³H] leucine 和 [³H] uridine 掺入小鼠肝组织蛋白质和RNA的影响 结果见表1

Tab 1. Effect of PASPA on incorporation of [³H] leucine and [³H] uridine into protein and RNA in mouse liver *in vivo*

Group	[³ H] leucine	[³ H] uridine
(mg/kg)	(cpm/mg protein)	(cpm/mg RNA)
Control 0	4611 \pm 1048	2599 \pm 1070
PASPA 30	6623 \pm 1422 **	4808 \pm 2091 *

由表 1 可知, 鹿茸多胺 30 mg/kg 对 [^3H]leucine 和 [^3H]uridine 掺入小鼠肝组织蛋白质和 RNA 有明显的促进作用

二. 鹿茸多胺对小鼠肝细胞核 RNA 聚合酶活性影响

于末次给药后 1 h, 断头处死小鼠, 取肝组织按前述方法分离制备 RNA 聚合酶并测其活性, 结果见表 2。

Tab 2. Effect of PASPA treatment on RNA polymerase activity in mouse liver

Treatment		[^3H] CMP incorporation (CMP) (C)		
		Control	PASPA (30 mg/kg)	Increase (%)
Exp. 1 ^a				
Incubation	10 min	987	1640	66
	20 min	1739	3103	78
	30 min	2014	3413	69
Exp. 2 ^b				
Protein	100 μg	945	1577	67
	200 μg	1145	2069	81
	300 μg	1191	2082	75

a: Incubated with 200 μg of liver protein and 1.85×10^4 Bq of [^3H] CTP for the indicated periods.

b: Incubated with the indicated amounts of protein and 1.85×10^4 Bq of [^3H] CTP for 15 min. c: Values are the mean of 2 tubes.

由表 2 可见, 经多次灌胃给药后, 鹿茸多胺对 RNA 聚合酶活性有明显的促进作用, 其中以 200 μg 酶蛋白和温孵 20 min 的实验条件下, 给药组酶活性增加显示最明显。

三. 鹿茸多胺对小鼠肝细胞 RNA 聚合酶 I, II 和 III 活性的影响

根据 Iijima 和 Higashi 方法⁽⁵⁾, A 系统可测出 RNA 聚合酶 I 和 50% RNA 聚合酶 II

Tab 3. Activities of RNA polymerases I, II and III in the liver of PASPA treated mice

RNA	polymerase	[^3H] CMP Incorporation (cpm/mg protein)		increase (%)
		Control	PASPA (30 mg/kg)	
RNA	polymerase I	2461 \pm 245	2720 \pm 640	10
RNA	polymerase II	10599 \pm 1102	17742 \pm 1577 **	67
RNA	polymerase III	4745 \pm 357	5660 \pm 380	19

Incubated with 200 μg of protein and 3.7×10^4 Bq of [^3H] CTP for 20 min. The number of animals in each group was 4. Incorp = Incorporation. **p < 0.001 as compared with control group.

的总活性。B系统可测出RNA聚合酶II和III的总活性,而C系统只能测出RNA聚合酶III的活性。取给药组和对照组小鼠肝组织,按前述方法测定RNA聚合酶I,II和III活性,结果见表3。

由表3可见,鹿茸多胺对RNA聚合酶II活性有明显的增强作用,而对RNA聚合酶I和III活性无明显的增强作用。

四. 体外鹿茸多胺对RNA聚合酶活性的影响

按前述方法从正常对照小鼠肝细胞核中分离制备RNA聚合酶并测定鹿茸多胺对其活性的影响,结果见表4。

Tab 4. Effect of PASPA on the RNA polymerase activity in mouse liver *in vitro*

PASPA ($\mu\text{g/ml}$)	[^3H] CMP incorporation (cpm)	Increase (%)
0	2225	
1	4378	97
10	3292	48
100	2517	12
1000	2898	30

Incubated with 200 μg of protein prepared from control mice, 1.85×10^4 Bq of [^3H] CTP and the indicated concentration of PASPA for 20 min. Values are the means of 2 tubes.

由表4可见,在低浓度(1~10 $\mu\text{g/ml}$)时,鹿茸多胺对RNA聚合酶活性有显著的增强作用,而在高浓度(100, 1000 $\mu\text{g/ml}$)时,对RNA聚合酶活性无明显的增强作用。

讨 论

鹿茸多胺 30 mg/kg 在促进小鼠肝组织核酸和蛋白质合成时,同时使核RNA聚合酶活性明显增强。

由于RNA聚合酶I对 α -amanitine不敏感;而RNA聚合酶II对 α -amanitine敏感(当 α -amanitine为0.15 $\mu\text{g/ml}$)时,RNA聚合酶II活性100%受到抑制),但需0.1 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 存在;RNA聚合酶III对 α -amanitine中度敏感(当 α -amanitine为200 $\mu\text{g/ml}$ 时,RNA聚合酶III活性100%受到抑制),而不需要硫酸铵⁽⁸⁾。另外,在高浓度硫酸铵存在时,如实验三B和C系统中,RNA聚合酶I不表现出活性⁽⁹⁾。我们参照Iijima和Higashi⁽⁷⁾设计测定RNA聚合酶I,II和III活性的三个(A,B和C)反应系统,证明了鹿茸多胺主要增强RNA聚合酶II的活性,对RNA聚合酶I和III的活性无明显影响。因此,鹿茸多胺刺激小鼠肝组织RNA和蛋白质合成效应是由于其能明显增强RNA聚合酶II活性的缘故。

另外,我们以前的报告⁽¹⁾和本实验结果表明,鹿茸多胺须在较适宜的剂量或浓度下才对RNA聚合酶活性有明显的增强作用,这与文献中报道的腐胺、精脞和精胺等多胺类物质对RNA聚合酶活性影响的特点是一致的^(10~12)。

鹿茸多胺调节 RNA 和蛋白质合成的生物效应可为其多种治疗作用的药理学基础。从我们对鹿茸多胺化学分析结果 (未发表资料) 来看, 总鹿茸多胺含量为 $438 \mu\text{g/g}$ (干组织), 其尖端部分胺含量为 $450 \mu\text{g/g}$ 。鹿茸多胺主要由腐胺、精脞和精胺组成。鹿茸的不同部位所含多胺不但含量差异很大, 而且质量也有明显区别。例如, 鹿茸尖端多胺含量比鹿茸基底部含量高出 $12 \sim 16$ 倍; 其中以精脞为主, 而鹿茸中下部则以腐胺为主。现已知在多胺中, 以精脞的生物活性最强⁽¹⁰⁾。由于鹿茸不同部位所含多胺有质和量的差异, 根据我们的化学分析结果, 无疑鹿茸尖端促进核酸和蛋白质合成作用最强。近几年来生化学研究证明, 多胺类物质是一类具有多种生物活性的物质, 其对动植物的生长发育有密切关系。最近 Schuber⁽¹³⁾ 报告, 多胺与细胞膜功能有密切关系, 其对膜转移 K^+ , H^+ 和 Ca^{2+} 有影响, 多胺可增强细胞膜内与磷脂和甘油酯生物合成有关系的各种酶的活性。可以设想含有多种丰富多胺类物质的鹿茸, 可能会有新的药理作用, 值得进一步研究。

参 考 文 献

1. Wang BX, et al. Effects of repeated administration of deer antler extract on biochemical changes related to aging in senescence-accelerated mice. *Chem Pharm Bull* 1988; **36**: 2587.
2. Wang BX, et al. Stimulating effect of deer antler extract on protein synthesis in senescence-accelerated mice *in vivo*. *Ibid* 1988; **36**: 2593.
3. 王本祥, 等. 鹿茸有效成分对小鼠肝脏 RNA 和蛋白质合成的影响. *药理学报* 1990; **25**: 321.
4. Hiai M, et al. Stimulating effect of *panax ginseng* extract on RNA polymerase activity in rat liver nuclei. *Chem Pharm Bull* 1971; **19**: 1656.
5. Iijima M and Higashi T. Effect of ginseng saponins on nuclear ribonucleic acid (RNA) metabolism. II. RNA polymerase activities in rats treated with ginsenoside. *Ibid* 1979; **27**: 2130.
6. Lowry OH, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; **193**: 265.
7. Schjeide OA. Micro estimation of RNA by the cupric ion catalyzed orcinol reaction. *Anal Biochem* 1969; **27**: 473.
8. Weil PA and Blattli Sp. Partial purification and properties of calf thymus deoxyribonucleic acid dependent RNA polymerase III. *Biochemistry* 1975; **14**: 1636.
9. Schwartz LB, et al. Isolation and partial characterization of the multiple forms of deoxyribonucleic acid-dependent ribonucleic acid polymerase in the mouse myeloma MOPC 315. *J Biol Chem* 1974; **249**: 5889.
10. Tabor CW and Tabor H. 1,4-diaminobutane (putrescine), spermidine and spermine. *Annu Rev Biochem* 1976; **45**: 285.
11. Janne O, et al. DNA-dependent RNA polymerase I and II from kidney. Effect of polyamines on the *in vitro* transcription of DNA and chromatin. *Biochemistry* 1975; **14**: 3589.
12. Moruzzi G, et al. The effect of spermine on transcription of mammalian chromatin by mammalian deoxyribonucleic acid-dependent ribonucleic acid polymerase. *Biochem J* 1975; **146**: 697.
13. Schuber F. Influence of polyamine on membrane functions. *Ibid* 1989; **250**: 1.

EFFECT OF POLYAMINES ISOLATED FROM PILLOSE ANTLER (PASPA) ON RNA POLYMERASE ACTIVITIES IN MOUSE LIVER

BX Wang, XG Chen, HB Xu, W Zhang and J Zhang

(Department of Pharmacology, Academy of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica of Jilin Province, Changchun 130021)

ABSTRACT The incorporations of [^3H] leucine into protein and [^3H] uridine into RNA in mouse liver were increased when PASPA was given to mice at a dose of 30 mg/kg for 4 successive days. The RNA polymerase activity, especially the RNA polymerase II activity in the solubilized liver nuclear fraction of PASPA-treated mice was also increased. *In vitro* experiment demonstrated that PASPA increased the RNA polymerase activity significantly in mouse liver nuclei at a concentration of 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. These results suggest that the enhancement of RNA polymerase activities, particularly RNA polymerase II activity, induced by PASPA treatment is responsible for the increase in syntheses of protein and RNA in mouse liver tissue.

Key words Polyamines of Pilose antler (PASPA); Protein; RNA; RNA polymerase II